-Proteostain-
Protein Quantification Kit-Wide Range *(500 tests, 2500 tests)*
Technical Manual

はじめに

タンパク質濃度の検出方法として、Lowry 法、Bicinchoninate 法 (BCA 法)、Biuret 法、Bradford 法等が知られています。Lowry 法と BCA 法は最もポピュラーなタンパク質定量法ですが、これらの方法は二価の銅イオンがアルカリ性でタンパク質によって一価の銅イオンに還元され、Lowry 法ではこの一価銅による Folin 試薬の還元、BCA 法では一価銅に特異的なキレートによる発色に基づいた方法です。このため測定時に高濃度の二価の銅イオンを必要とします。本キットは塩基性条件での Tetrazolium salt の還元反応を利用したものです。Tetrazolium salt は、タンパク質により容易に還元され Formazan dye を生成します。WST-8 の Formazan dye は中性域では黄色を示しますが、高 pH 域では青色を示し、pH12.5 以上では 650 nm に極大吸収を持ちます。本キットはマイクロプレートアッセイに対応しており定量できるタンパク質の濃度範囲は 50 μg/ml ～ 5,000 μg/ml です。

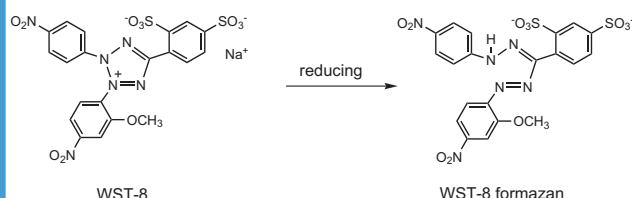



Fig.1 WST-8 とその Formazan dye の構造式

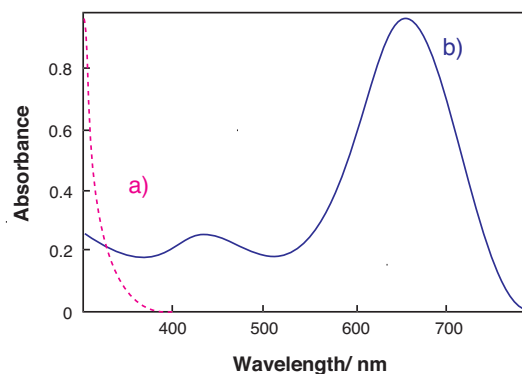



Fig.2 WST-8 の吸収スペクトル
a) タンパク質無し　b) タンパク質あり (BSA 2,000 μg/ml)

キット内容

<500 tests>

WST-8 solution	…………	10 ml × 1
Buffer solution	…………	100 ml × 1
Standard BSA solution (10,000 μg/ml)	…………	1.5 ml × 1

<2500 tests>

WST-8 solution	…………	50 ml × 1
Buffer solution	…………	500 ml × 1
Standard BSA solution (10,000 μg/ml)	…………	1.5 ml × 2

保存条件

0 ～ 5℃の遮光条件で保存してください。WST-8 solution は 0 ～ 5℃で 12 ヶ月、室温では 3 ヶ月安定です。また Buffer solution は室温で 18 ヶ月安定です。しかし炭酸ガスを吸収して pH が低下する恐れがありますので使用後はしっかりとキャップを締めて下さい。BSA solution は 0 ～ 5℃で 12 ヶ月安定です。

必要なもの（キット以外）

- マイクロプレートリーダー（650 nm フィルター）
- 96 穴マイクロプレート
- 20 μl、200 μl マイクロピペッター（可変式）
- 1.5 ml チューブ

（マイクロプレートリーダーがない場合吸光光度計でも測定できます。）

使用上のご注意

- タンパク種により感度の変化が生じますので、Table 2 の変動値を考慮して下さい。更に正確な値を得るためには同じタンパク種を検量線用の標準物としてご使用下さい。
- Buffer solution はアルカリ性です。取扱いには充分注意して下さい。また炭酸ガスを吸収して pH が低下する恐れがあります。使用後はしっかりとキャップを締めて下さい。
- Buffer solution の pH 変動によって感度が変化することが考えられますので、毎回サンプルと同じプレートで Standard BSA solution か基準となるタンパクを測定して変動を補正してください。
- WST-8 は Buffer solution との混合後は光安定性が低下しバックグラウンドの吸光度が上昇する恐れがありますのでインキュベーションの間は遮光してください。
- 本キットにはガラス製容器を使用しております。保護手袋をご着用頂くなど取扱にはご注意下さい。

プロトコール

1. マイクロプレート法

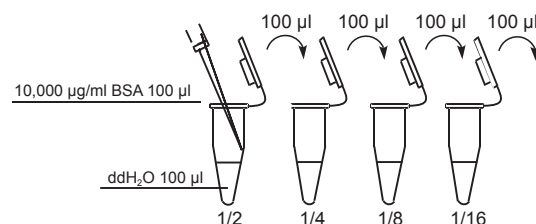
1) Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0 ～ 5,000 μg/ml の BSA 希釈溶液を調製する (Fig.3) 。
2) Buffer solution 180 μl を各ウェルに加える。
3) 1) で調製した各濃度の検量線用 BSA 希釈溶液、またはサンプル 20 μl を各ウェルに加え混合する。検量線は n=3 にすることが望ましい。
4) WST-8 solution 20 μl を各ウェルに加え、良く混合する。
5) プレートにアルミホイル等でカバーをして 37℃で 30 分インキュベートする。Buffer solution との混合後の WST-8 は光安定性が低下し、バックグラウンドの吸光度が上昇する恐れがあるので、インキュベーションの間は遮光しておく。

10,000 μg/ml の Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈し、5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78, 0 μg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。

Fig. 3 検量線作成用 BSA 希釈溶液の調製方法

6) プレートリーダーを使用して 650 nm の吸光度を測定する。
7) 各ウェルの吸光度からブランク (BSA:0 μg/ml) の吸光度を差し引く。
8) 横軸に BSA の濃度を取り、BSA 希釈溶液の吸光度から検量線を作成する (Fig.4)。
9) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。

Fig.4 Standard BSA solution で作成した検量線の例（マイクロプレート法）

2. セル法 [吸光光度計を用いて測定を行う場合は以下のプロトコールに従って測定してください。]

1) マイクロプレート法と同様に Standard BSA solution を純水で順次 1/2 に希釈して 0 ～ 5,000 μg/ml の BSA 希釈溶液を調製する。
2) Buffer solution 2.25 ml を試験管に入れる。
3) 1) で調製した各濃度の検量線用 BSA 希釈溶液、またはサンプル 50 μl を加え混合する。
4) さらに WST-8 solution 250 μl を加え、良く混合する。
5) 試験管をアルミホイル等で遮光して 37℃で 1 時間インキュベートする。Buffer solution との混合後の WST-8 は光安定性が低下し、バックグラウンドの吸光度が上昇する恐れがあるので、インキュベーションの間は遮光しておく。
6) 反応溶液を分光光度計用のセル (1cm×1cm) に移し替え、650 nm の吸光度を測定する。
7) 測定された吸光度からブランク (BSA: 0 μg/ml) の吸光度を差し引く。
8) 横軸に BSA の濃度を取り、BSA 希釈溶液の吸光度から検量線を作成する (Fig.5)。
9) 検量線を基にサンプルのタンパク質濃度を算出する。

Fig.5 Standard BSA solution で作成した検量線の例（セル法）

阻害物質の影響

本キットで測定に影響を及ぼさない阻害物質の最大濃度を Table 1 に記載します。

Table 1 測定に影響を及ぼさないサンプル中の阻害物質の最大濃度 *

Chemical	Concentration
Detergent	
Brij 35	2 %
Brij 56	1 %
Brij 58	1 %
Triton X-100	1 %
Triton X-114	1 %
Tween 20	0.5 %
Tween 80	0.3 %
SDS	1 %
CHAPS	4 %
CHAPSO	2 %
MEGA 10	0.5 %
Octyl-β-D-glucoside	0.5 %
Organic sovent	
Ethanol	10 %
Isopropanol	10 %
DMSO	10 %

Chemical	Concentration
Chelating agent	
EDTA	2.5 mmol/l
DTPA	0.625 mmol/l
Salt	
Sodium chloride	0.5 mol/l
Potassium chloride	1 mol/l
Sodium acetate	0.2 mol/l
Sodium bicarbonate	6.25 mmol/l
Buffer	
Citrate pH5.0	0.6 mmol/l
MES pH6.1	12.5 mmol/l
Tris pH7.4	2.5 mmol/l
PBS	Undiluted
HEPES pH7.5	12.5 mmol/l
CHES pH9.0	12.5 mmol/l

＊無添加の BSA による検量線との誤差が 5%以内の濃度。

タンパク種による変動

本キットは検量線用のタンパク質として BSA を用いていますが、すべてのタンパク種に対し、この検量線を使うことはできません。タンパク種による感度の変動を Table 2 に示します。

Table 2 タンパク種による感度の変動

Protein	Protein vs. BSA [a)]
BSA	1.00
Chymotrypsinogen A	0.75
Transferrin	0.97
Human IgG	0.37

a) 値は検量線の傾きの比を示す。
（タンパク種の傾き /BSA での傾き）

＜開発元＞
Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30 W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687,URL: www.dojindo.com

＜委託製造元＞
株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
ドージン・イースト（東京） Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650